

VU Research Portal

Metal bioavailability to *Folsomia candida*: towards biotic ligand modeling and bioaccumulation kinetics approaches

Ardestani, M.M.

2014

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Ardestani, M. M. (2014). *Metal bioavailability to *Folsomia candida*: towards biotic ligand modeling and bioaccumulation kinetics approaches*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Biologische beschikbaarheid van metalen voor *Folsomia candida* benaderd met biotische ligand-modellering en bioaccumulatie-kinetiek

Industriële activiteiten hebben geleid tot een emissie van metalen naar het milieu. Dit heeft geresulteerd in een toename van metaalgehalten in de bodem tot boven het natuurlijke achtergrondniveau. Op veel plaatsen, bijvoorbeeld dicht bij industriële bronnen, worden metaalgehalten gevonden die aanleiding geven tot bezorgdheid over de gezondheid van mens en milieu. Risicobeoordeling van verontreinigde locaties kan inzicht geven in de kans op ecologische schade en eventuele nadelige effecten op de volksgezondheid. Een risicobeoordeling is doorgaans gebaseerd op een vergelijking van toxicologische effect-concentraties met biologisch beschikbare concentraties in de bodem. Dit proefschrift behandelt één aspect van de risicobeoordeling: de wetenschappelijke onderbouwing van schattingen van biologische beschikbaarheid van metalen in de bodem voor bodemorganismen. Het voornaamste doel van dit proefschrift was het bepalen van de biologische beschikbaarheid van metalen voor een representatief bodemorganisme, de springstaart *Folsomia candida*.

De poriewater-hypothese veronderstelt dat metalen beschikbaar zijn voor bodemorganismen, wanneer zij zijn opgelost in het bodemvocht of poriewater. Na opname vanuit het poriewater kunnen metalen ophopen op zogenaamde biotische liganden (BL); dit zijn bindingsplaatsen voor metalen op of in deze organismen. Het voorkomen van metalen in verschillende chemische vormen wordt aangeduid als speciatie. De vrije metaalionen zijn de vormen waarin metaal het best beschikbaar is voor opname door organismen, en de vrije metaalion-activiteit in het poriewater is de beste maat voor biologische beschikbaarheid. Er zijn echter twee factoren die een grote invloed hebben op de vrije metaalion-activiteit: 1) de aanwezigheid van andere kationen (bijv. Ca^{2+} , Mg^{2+} , en protonen (pH)) die concurreren met het vrije metaalion voor binding aan de BL plaatsen, en 2) complexatie van de vrije metaalionen met organische en anorganische liganden in het poriewater, zoals opgelost organisch koolstof (DOC), andere metaalvormen en anionen. Grond is

echter een veel complexer medium dan water, met een grote invloed van de vaste fase op de metaalspeciatie in het poriewater.

Biologische beschikbaarheid is metaal- en soort-specifiek, waarbij er onderscheid gemaakt kan worden tussen essentiële en niet-essentiële metalen. In dit proefschrift zijn koper en cadmium gebruikt om het verschil in biologische beschikbaarheid voor bodemdieren te bepalen tussen essentiële en niet-essentiële metalen.

Springstaarten zijn één van de meest voorkomende groepen van bodemorganismen en ze spelen een belangrijke rol in het functioneren van het bodemecosysteem. Om die reden worden ze ook gebruikt als testorganismen in toxiciteitstesten voor de bodem. In dit proefschrift is de springstaart *Folsomia candida* gebruikt als testorganisme; deze soort wordt al meer dan 40 jaar gebruikt in bodemtoxiciteitsonderzoek. De voornaamste route waarlangs springstaarten worden blootgesteld aan metalen in het poriewater is via de ventrale tubus en via de cuticula.

Biologische beschikbaarheid is een kernbegrip in de risicobeoordeling van metaal-verontreinigde bodems. Het kent diverse aspecten, zoals enerzijds de route van blootstelling, metaalspeciatie en biotische-ligand modellering (BLM) en anderzijds de kinetiek en dynamiek van metaalopname en de ontwikkeling van toxische effecten in de tijd. Om die reden is dit proefschrift opgebouwd uit twee delen: het eerste deel betreft biotische ligand modellering (Hoofdstukken 2-5), en het tweede deel gaat in op de modellering van toxicokinetiek van metalen (Hoofdstuk 6-10). In hoofdstuk 10 worden toxicokinetiek en BLM met elkaar verbonden om zo te komen tot een geïntegreerde benadering van de biologische beschikbaarheid van metalen (zie Figuur 2 in Hoofdstuk 1).

Blootstelling aan waterige oplossingen

Toxiciteitstesten met bodemorganismen worden meestal uitgevoerd met kunstmatige of natuurlijke gronden. De complexiteit van de chemische processen in de bodem, zoals sorptie en desorptie, en de dominante rol van de vaste fase in deze processen, maken het moeilijk om biologische beschikbaarheid goed te

onderzoeken in echte gronden. Omdat poriewater de voornaamste route van blootstelling aan metalen vormt voor springstaarten, is in dit proefschrift geprobeerd deze complexiteit van de bodem te omzeilen door blootstellingen uit te voeren in oplossingen die het poriewater nabootsen. Voordeel van de testen in oplossingen met een eenvoudige samenstelling is dat de experimentele condities en daarmee ook de metaalspeciatie goed gecontroleerd kunnen worden. Dat maakt het mogelijk om de factoren die van invloed kunnen zijn op de biologische beschikbaarheid van metalen, zoals de concentratie van andere kationen, de pH of het gehalte aan opgeloste organische stof, één voor één te onderzoeken.

Het werken met blootstellingen aan eenvoudige oplossingen kent echter ook een aantal beperkingen. De omstandigheden kunnen te kunstmatig zijn, waardoor de testorganismen zich anders gedragen dan in grond. Ze kunnen zich bijvoorbeeld minder goed bewegen door de testmatrix, waardoor processen als de vervelling in geleedpotigen of de vernieuwing van de slijmlaag op de huid van regenwormen niet optimaal verlopen. Daarnaast treedt voedselgebrek op. Hierdoor kan sprake zijn van extra stress. Een ander nadeel is dat met het gebruik van nogal vereenvoudigde waterige testmedia voorbij wordt gegaan aan de interactie tussen fysisch-chemische parameters die plaatsvindt in natuurlijke gronden, zoals tussen pH en kationen-uitwisselcapaciteit (CEC) of de kationensamenstelling van het poriewater, of het effect van opgeloste organische stof op de metaalspeciatie. In natuurlijke gronden zijn dergelijke interacties van grote invloed op de biologische beschikbaarheid van metalen. Toch is vanwege de genoemde voordelen in dit proefschrift gebruik gemaakt van eenvoudige oplossingen met slechts één kation of met een mengsel van kationen (Hoofdstukken 3, 4, 5 en 7).

In hoofdstuk 5 is zowel een 0,2 mM calciumoplossing als een multi-kationenoplossing (Na, K, Mg, Ca) gebruikt om het effect van koper te onderzoeken. In de Hoofdstukken 3 en 4 is gebruik gemaakt van oplossingen met verschillende calciumconcentraties om de toxiciteit en bioaccumulatie van cadmium en koper te bepalen. In hoofdstuk 8 is inert kwartszand verzadigd met de multi-kationenoplossing gebruikt als testmedium om de toxicokinetiek en toxicodynamiek van cadmium in *F. candida* te bepalen. De overleving van *F.*

candida was nog goed (> 80%) na 11 dagen bij gebruik van oplossingen met alleen 0,2 mM calcium of in de multi-kationenoplossing (Hoofdstuk 5). In testen met verschillende pH en verschillende calciumgehalten was de overleving echter matig (35-40% na 7 dagen; Hoofdstukken 3 en 4). De beste overleving van de springstaarten werd gevonden bij gebruik van een medium met kwartszand verzadigd de multi-kationenoplossing (Hoofdstuk 8). Dit medium lijkt de minste stress te veroorzaken bij de dieren.

Geconcludeerd kan worden dat waterige oplossingen met alleen calcium of een mengsel van kationen en inert kwartszand met daarin een oplossing van kationen geschikte media zijn voor korte termijnonderzoek naar de biologische beschikbaarheid van metalen voor *F. candida*. In beide typen media kan de blootstelling aan metalen goed gecontroleerd worden.

Invloed van kationen

Calcium en pH zijn de twee belangrijkste factoren die de biologische beschikbaarheid van metalen beïnvloeden. Dit werd bevestigd in zowel toxiciteitstesten met cadmium en koper (Hoofdstukken 3, 4 en 5) als in bioaccumulatie-testen met koper (Hoofdstuk 7). Al deze testen met *F. candida* werden uitgevoerd in waterige oplossingen.

Voor koper werden 7-dagen LC₅₀ waarden berekend van 2,3-20 µM voor *F. candida* na blootstelling in oplossingen met verschillende calciumgehalten en pH-waarden (Hoofdstuk 4). De LC₅₀ was iets hoger in een oplossing met 0,2 mM Ca of de multi-kationenoplossing met pH 6,0 (Hoofdstuk 5). Deze waarden zijn lager dan de 21-dagen EC₅₀ waarden die in de literatuur werden gevonden voor *F. fimetaria* gebaseerd op 0,01 M CaCl₂ extraheerbare kopergehalten in verontreinigde veldgronden.

Voor cadmium werden 7-dagen LC₅₀ waarden gevonden van 0,63-3,8 mM voor *F. candida* blootgesteld in waterige oplossingen met verschillende pH-waarden en calciumgehalten (Hoofdstukken 3 en 5). Deze waarden komen vrij goed overeen met de 28-35 dagen LC_{50s} voor *F. candida* gebaseerd op gehalten in het poriewater van natuurlijke of kunstmatige gronden die met cadmium waren behandeld.

In alle testen met waterige oplossingen namen de interne koper- en cadmiumgehalten in de springstaarten lineair toe met toename van de blootstellingsconcentratie (Hoofdstukken 3, 4 en 5). Dit werd voor beide metalen gevonden in de 0,2 mM Ca- en de multi-kationenoplossingen (Hoofdstukken 3 en 5), voor koper ook bij verschillende calciumconcentraties en pH-waarden (Hoofdstuk 4) en voor cadmium ook in kwartszand verzadigd met een multi-kationenoplossing (Hoofdstuk 8).

Bij blootstelling van *F. candida* aan niet-letale kopergehalten in oplossingen met twee verschillende calciumgehalten en twee verschillende pH-waarden of in grond met bij drie verschillende pH-waarden bleven de interne kopergehalten vrij constant op 3,1-4,7 $\mu\text{mol/g}$ lichaamsgewicht (Hoofdstukken 7 en 9). Deze gehalten komen overeen met waarden uit de literatuur voor dieren blootgesteld aan vervuilde gronden.

Geconcludeerd kan worden dat de LC_{50} waarden en bioaccumulatie-niveaus in de verschillende testen met *F. candida* sterk overeen kwamen, hetgeen bevestigt dat blootstelling voornamelijk via het poriewater plaatsvindt. Er werden ook goede relaties gevonden tussen interne metaalgehalten in de dieren en blootstellingsconcentraties en tussen de overleving en interne metaalgehalten bij blootstelling aan waterige oplossingen (Hoofdstukken 3 en 4).

Biotische ligand-modellering

De toepasbaarheid van BLM modellering voor *F. candida* is in dit proefschrift onderzocht met experimenten waarin de dieren werden blootgesteld aan cadmium en koper in waterige oplossingen (Hoofdstukken 3 en 4). In hoofdstuk 2 zijn de afgeleide bindingsconstanten voor binding van deze metalen aan biotische liganden vergeleken met waarden uit de literatuur.

Volgens het principe van BLM concurreren kationen met het vrije metaalion om binding aan de biotische liganden op/in het organisme, waardoor ze de toxiciteit van het metaal kunnen verminderen. De giftigheid van koper voor *F. candida* in oplossingen bleek echter niet significant te worden beïnvloed door calcium of protonen. Bovendien was in de testen met koper sprake van hormesis: een

stimulering van de overleving bij lagere, niet-letale blootstellingsconcentraties ($< 0,1 \mu\text{M Cu}$, Hoofdstuk 4). Daardoor was het moeilijk te komen tot een eenduidige conclusie over de mogelijke beschermende werking van calcium en protonen op de toxiciteit van koper. Uit de resultaten van deze experimenten kon een constante voor de binding van koper aan de biotische ligand van *F. candida* worden berekend van 5,19 ($\log K$, L/mol) (Hoofdstuk 4), welke aardig overeen komt met een waarde die in de literatuur wordt gerapporteerd voor dieren die in grond waren blootgesteld. Dit laat zien dat de affiniteit van koper voor de dieren vergelijkbaar is voor blootstellingen in grond en in oplossingen; dit bevestigt de toepasbaarheid van waterige oplossingen voor onderzoek aan BLM met springstaarten.

De hoge waarde voor $\log K_{\text{H-BL}}$ van 5,04, die werd gevonden in de toxiciteitstesten met koper in waterige oplossingen, geeft aan dat protonen vrijwel even sterk binden op de biotische liganden van *F. candida* als vrije koperionen (Hoofdstuk 4). Deze waarde is echter veel hoger dan de waarde die in de literatuur wordt gerapporteerd voor dieren die in grond zijn blootgesteld. Dit suggereert dat in grond andere factoren de binding van protonen aan de dieren beïnvloeden. Voor de binding van calcium werd een lage $\log K_{\text{Ca-BL}}$ waarde van 2,12 berekend, wat aangeeft dat calcium nauwelijks met de vrije koperionen concurreert voor bindingsplaatsen op de biotische liganden van *F. candida* (Hoofdstuk 4).

Calcium en protonen hadden nauwelijks invloed op de toxiciteit van cadmium in waterige oplossingen (Hoofdstuk 3). Bij blootstelling in grond werd de opname van cadmium in *F. candida* niet beïnvloed door de pH wanneer werd gekeken naar het totaalgehalte in de grond. Wanneer opname werd gerelateerd aan de cadmiumconcentratie in het poriewater was er sprake van een duidelijke afname bij afname van de pH, wat duidt op een sterk concurrerend effect van protonen (Hoofdstuk 10).

Op grond van blootstellingen in eenvoudige waterige oplossingen werden constanten voor de binding van cadmium aan de biotische liganden van *F. candida* berekend van 1,62-2,31 (\log , L/mol) (Hoofdstuk 3). Deze $\log K$ waarden zijn vele orden van grootte lager dan de waarden gerapporteerd voor dieren blootgesteld aan cadmium in natuurlijke LUFA 2.2 grond bij verschillende pH (Hoofdstuk 10). Dit

geeft aan dat de experimentele omstandigheden (oplossing versus grond) wel een grote invloed kunnen hebben. De bindingsconstanten voor calcium en protonen waren vrijwel gelijk voor beide studies. Opvallend was ook dat de bindingsconstante voor calcium veel lager was dan die voor protonen, hetgeen suggereert dat calcium veel minder sterk concurreert met cadmium voor binding aan de biotische liganden van *F. candida*. De overeenkomst in log *K* waarden voor cadmium en calcium bij blootstelling van *F. candida* in oplossingen is in overeenstemming met de overeenkomst in opnameroute van Cd²⁺ en Ca²⁺ ionen; algemeen wordt aangenomen dat deze ionen worden opgenomen via dezelfde ionkanalen omdat ze een vergelijkbare lading en atoomdiameter hebben.

Geconcludeerd wordt dat de log *K* waarden voor protonen, calcium, cadmium, en koper vrij constant zijn over verschillende studies. Dit bevestigt de toepasbaarheid van blootstellingen in waterige oplossingen voor BLM-onderzoek aan *F. candida*.

Opname- en eliminatiekinetiek

Mechanistische benaderingen, zoals toxicokinetiek en toxicodynamiek, zijn in dit proefschrift toegepast om meer inzicht te krijgen in de biologische beschikbaarheid van cadmium en koper (Hoofdstukken 5, 7, 8, 9, en 10). Het effect van de pH op de toxicokinetiek van koper en cadmium is verder onderzocht in Hoofdstukken 9 en 10. Tenslotte wordt in Hoofdstuk 6 een overzicht gegeven van de literatuur over de toxicokinetiek van metalen in bodemorganismen.

In verschillende hoofdstukken van dit proefschrift is de factor tijd meegenomen bij het bepalen van de accumulatie van metalen in *F. candida* bij blootstelling in verschillende media. Bij blootstelling in eenvoudige waterige oplossingen bleken calcium en protonen nauwelijks invloed te hebben op de opname van koper in de dieren (Hoofdstuk 7). De interne kopergehalten in de dieren bleven vrijwel constant in deze testen. Ook bij blootstelling van *F. candida* aan koper in LUFA 2.2 grond, die op verschillende pH-waarden was gebracht, werd geen significante opname van koper gevonden. Dit laat zien dat het effect van de pH te klein was om de koper-accumulatie in de dieren te beïnvloeden (Hoofdstuk 9). *F. candida* was in staat het interne kopergehalte te reguleren op waarden van 3,1-4,7 µmol/g

lichaamsgewicht, zowel in oplossingen (Hoofdstuk 7) als in LUFA 2.2 grond (Hoofdstuk 9). Dit duidt op de aanwezigheid van sterke regulatiemechanismen, waardoor de interne koperconcentratie in *F. candida* constant gehouden kan worden over een ruime range van blootstellingsomstandigheden.

De biologische beschikbaarheid van cadmium is bepaald door de opname- en eliminatiekinetiek te meten in kwartszand verzadigd met een multi-kationenoplossing (Hoofdstuk 8). Cadmiumgehalten in de dieren namen toe met de tijd. Wanneer zowel de opname als ook de eliminatie in één experiment werden gemeten, konden de opname- en eliminatiesnelheidsconstanten nauwkeuriger worden bepaald. Dit gaf waarden van $0.18 \text{ L kg}_{\text{dier}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ respectievelijk 0.02 d^{-1} . Wanneer dieren gedurende 21 dagen in LUFA 2.2 grond werden blootgesteld, gevolgd door 21 dagen in schone grond, werd geen effect van de pH gevonden op de opnamekinetiek van cadmium (Hoofdstuk 10). Ook de interne cadmiumgehalten in de dieren verschilden niet voor de drie onderzochte pH-waarden. De cadmiumgehalten in het poriewater namen echter toe bij afname van de pH. Wanneer de cadmiumopname werd gerelateerd aan de gehalten in het poriewater, namen de opnamesnelheidsconstanten toe bij toename van de pH, van 0,005 tot $0,581 \text{ L g}_{\text{animal}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Dit is in overeenstemming met de BLM principes en toont aan dat cadmium sterker wordt opgenomen wanneer minder protonen in het poriewater aanwezig zijn (Hoofdstuk 10).

Bij blootstelling in grond werd een hoge eliminatiesnelheidsconstante (0,13-0,46 per dag) gemeten, die ervoor zorgde dat de interne cadmiumgehalten in *F. candida* evenwicht bereikten binnen 10-14 dagen (Hoofdstuk 10). Bij blootstelling in kwartszand verzadigd met een multi-kationenoplossing bleven de cadmiumgehalten in de dieren echter toenemen in de tijd (Hoofdstuk 8). Hierdoor waren de eliminatie-snelheidsconstanten in deze studie een factor 10 tot 20 lager dan in grond (Hoofdstuk 10). Dit verschil kan mogelijk worden verklaard door het feit dat de dieren in water niet of nauwelijks vervelden, terwijl dat in grond wel mogelijk was. Vervelling is in springstaarten een belangrijk mechanisme om metalen uit het lichaam te verwijderen.

Het effect van de factor tijd op de toxiciteit van koper en cadmium voor *F. candida* is bepaald door toepassing van een toxicodynamische benadering voor blootstellingen in waterige oplossingen en in kwartszand verzadigd met een multi-kationenoplossing (Hoofdstukken 5 en 8). Bij blootstelling aan koper in zowel een 0,2 mM Ca oplossing als in een multi-kationenoplossing, en bij verschillende pH en calciumgehalten nam de LC_{50} af met de tijd (Hoofdstukken 4 en 5). Ook voor cadmium werd een afname van de LC_{50} met de tijd gezien in oplossingen met verschillende pH en calciumgehalten (Hoofdstuk 3).

Uiteindelijke LC_{50} waarden van 0,2-20 μM werden berekend voor de toxiciteit van koper voor *F. candida* in 0,2 mM Ca- en multi-kationenoplossingen. In oplossingen met verschillende calciumgehalten en verschillende pH bedroegen de uiteindelijke LC_{50} s 0,014-0,035 μM (Hoofdstuk 5). Dit verschil wordt mogelijk veroorzaakt door het verschil in samenstelling van de testoplossingen. Uit LC_{50} -tijd-relaties werd een eliminatiesnelheidsconstante voor koper afgeleid van $0,03\text{ d}^{-1}$ (Hoofdstuk 4 en 5).

Voor de toxiciteit van cadmium voor *F. candida* bij verschillende calciumgehalten en pH werden uiteindelijke LC_{50} waarden van 0,010-0,088 mM geschat. De eliminatiesnelheidsconstante geschat uit de overlevingsdata was vrijwel nul, wat overeenstemt met de lineaire toename van de cadmiumgehalten in de dieren bij blootstelling aan waterige oplossingen (Hoofdstukken 3 en 5). Dit kan enerzijds leiden tot een geleidelijke toename van de toxische schade in deze dieren, maar het laat ook zien dat er sprake kan zijn van een zeer efficiënte detoxificatie en opslag van cadmium in het lichaam.

Bij blootstelling van *F. candida* aan cadmium in kwartszand verzadigd met de multi-kationenoplossing nam de overleving ook dosis-gerelateerd af in de tijd (Hoofdstuk 8). LC_{50} waarden namen af van 10,8 mM na 2 dagen tot 0,71 mM na 21 dagen. Uit de LC_{50} -tijd-relatie werden een uiteindelijke LC_{50} van 0,51 mM en een eliminatiesnelheidsconstante van $0,025\text{ d}^{-1}$ afgeleid.

De resultaten van deze experimenten in waterige oplossingen of in kwartszand verzadigd met een multi-kationenoplossing bevestigen het belang van de factor tijd bij het bepalen van de biologische beschikbaarheid van metalen. Eliminatiesnelheidsconstanten gebaseerd op overlevingsdata kunnen meer inzicht geven in de

manier waarop dieren omgaan met een metaal. Voor cadmium liet het bijvoorbeeld zien dat de dieren dit metaal kunnen detoxificeren door het efficiënt op te slaan.

Toxicodynamiek

De toepasbaarheid van een gecombineerde benadering van toxicokinetiek en BLM om de biologische beschikbaarheid van metalen te bepalen is onderzocht in Hoofdstukken 2, 6, en 10. Om meer inzicht te verkrijgen in het mechanisme van de effecten van metalen op *F. candida*, werd de toxiciteit gerelateerd aan interne metal concentraties in de dieren. Overleving nam af met toename van het metaalgehalte in de dieren, totdat een niveau werd bereikt (de zogenaamde *lethal body concentration, LBC*) waarboven geen overleving meer werd gezien. LC₅₀ waarden van 35,2 en 135 µmol/g lichaamsgewicht werden afgeleid voor *F. candida* na 7 dagen blootstelling aan koper in een multi-kationenoplossing respectievelijk in 0,2 mM Ca (Hoofdstuk 5). In een andere studie werden LC₅₀ waarden gevonden van 2,36-376 en 4-25 µmol/g lichaamsgewicht voor dieren die 7 dagen waren blootgesteld aan cadmium respectievelijk koper bij verschillende calciumgehalten of pHs in waterige oplossingen (Hoofdstukken 3 en 4). De interne LC_{50s} (*LBC*) voor koper en cadmium waren hoger bij hogere calciumgehalten in de oplossingen. Dit is niet in overeenstemming met de verwachtingen op basis van het BLM concept.

Een overall LC₅₀ van 7,9 µmol/g lichaamsgewicht werd afgeleid voor *F. candida* na 21 dagen blootstelling aan cadmium in kwartszand verzadigd met een multi-kationenoplossing (Hoofdstuk 8). Deze waarde is slechts een factor 2 hoger dan de *LBC* van 4,6 µmol/g lichaamsgewicht. Dit laat dus zien dat er sprake is van een goede overeenstemming tussen de toxicokinetiek en toxicodynamiek van cadmium. Deze overeenkomst werd bevestigd door het feit dat beide benaderingen een vergelijkbare eliminatieconstante gaven.

Volgens de BLM benadering is het optreden van toxische effecten uitsluitend gerelateerd aan de fractie van de biotische liganden die bezet is met metaal. Deze fractie (f_f), die het netto resultaat is van de hoeveelheid metaal die is geaccumuleerd in het organisme, en onafhankelijk is van de samenstelling van het medium (poriewater), is dus een goede indicator voor toxiciteit. De f_{50} waarde die

met BLM modellen wordt berekend verklaart daarmee de effecten veroorzaakt door de opname van metalen. De f_{50} waarden voor koper en cadmium die zijn berekend in de Hoofdstukken 3 en 4 kwamen goed overeen met de waarden die in de literatuur zijn gerapporteerd voor andere organismen.

Om de ontwikkelde biotische ligandmodellen te valideren, zijn bindingsconstanten gebruikt om effecten te voorspellen. Zo werd de toxiciteit van koper en cadmium voor *F. candida* voorspeld op basis van BLM parameters berekend uit accumulatiegegevens (Hoofdstukken 3 en 4). Een goede correlatie werd gevonden tussen voorspelde en gemeten effecten. Dit bevestigt de toepasbaarheid van BLM voor springstaarten.

Algemene conclusies en aanbevelingen

De resultaten beschreven in dit proefschrift laten zien dat de samenstelling van het poriewater een grote invloed heeft op de biologische beschikbaarheid van metalen voor de bodemvertebraat *F. candida*. Variatie in de samenstelling van het poriewater, bijvoorbeeld in calciumgehalte of pH, leidt al snel tot verschillende resultaten. Milieuomstandigheden dienen dus goed gestandaardiseerd te worden in toxiciteitstesten met bodemorganismen. Bovendien is het belangrijk de blootstellingscondities goed te kennen wanneer de biologische beschikbaarheid van metalen bepaald wordt. BLM modellering, gecombineerd met een toxicokinetische analyse, kan een goed raamwerk bieden voor het ophelderen van mechanismen die mede bepalend zijn voor de biologische beschikbaarheid van metalen.

Het gebruik van blootstelling in kunstmatig poriewater lijkt zeer geschikt voor mechanistisch onderzoek naar de biologische beschikbaarheid van metalen voor *F. candida*. Dit geldt wellicht nog meer voor een medium van kwartszand verzadigd met kunstmatig poriewater.

Aangezien biologische beschikbaarheid een dynamisch proces is, moet de factor tijd worden meegenomen in toxiciteits- en bioaccumulatie-onderzoek. Een mechanistische benadering, waarbij toxicokinetiek en toxicodynamiek worden meegenomen, kan nuttig inzicht verschaffen in chemische en biologische

mechanismen die de biologische beschikbaarheid van metalen mee bepalen. Toepassing van deze benaderingen bevestigde dat verschillen in biologische beschikbaarheid metaal-specifiek zijn, waarbij koper gereguleerd wordt en cadmium accumuleert in een mate die afhangt van de eigenschappen van het medium. BLM-gebaseerde modellering lijkt toepasbaar voor *F. candida* blootgesteld aan waterige oplossingen (kunstmatig poriewater). Dit levert bindingsconstanten die goed overeenkomen met in de literatuur gerapporteerde waarden. De toxiciteit van metalen neemt over het algemeen toe bij toename van de log K waarde, waarbij wel opvallende verschillen (koper) of overeenkomsten (cadmium) te zien zijn tussen water- en bodemorganismen. In alle gevallen is de pH de belangrijkste factor die de relatie tussen toxiciteit en bindingsconstanten beïnvloedt.

BLM- en toxicokinetische modellen kunnen mogelijk toegepast worden in de risicobeoordeling van metalen in de bodem. De mechanistische kennis is echter nog matig ontwikkeld. Om toepassing van BLM voor bodemorganismen mogelijk te maken, is meer inzicht nodig in zowel de bodemchemie als de biologie van de organismen en de interactie tussen deze factoren. Vooral de tweede factor is van belang om de theoretische basis voor de biologische aspecten van biologische beschikbaarheid te vergroten.

Een BLM benadering is in feite gebaseerd op de aanname dat er sprake is van evenwicht, zowel wat betreft de chemische evenwichten tussen de verschillende vormen waarin het metaal voorkomt in het milieu als wat betreft de opname van het metaal in organismen en de daaruit voortvloeiende effecten. In de praktijk is echter zelden sprake van evenwicht. Toekomstig onderzoek naar de biologische beschikbaarheid van metalen dient daarom ook de temporele variatie in metaalspeciatie en blootstelling mee te nemen. Dit geldt ook voor de dynamiek van het organisme en de manier waarop het reageert op de blootstelling aan metalen. Dit vereist een geïntegreerde aanpak die toxicokinetiek en toxicodynamiek combineert met een BLM benadering.